

Синтез конъюгатов гиалуроновой кислоты с никотиновой кислотой

Сальникова Е.В., Лукина Е.С., Понеделькина И.Ю.

Институт нефтехимии и катализа РАН, пр. Октября 141, Уфа. Факс: 347 284 2750;
тел.: 347 284 2750; E-mail: mymailbelike@mail.ru

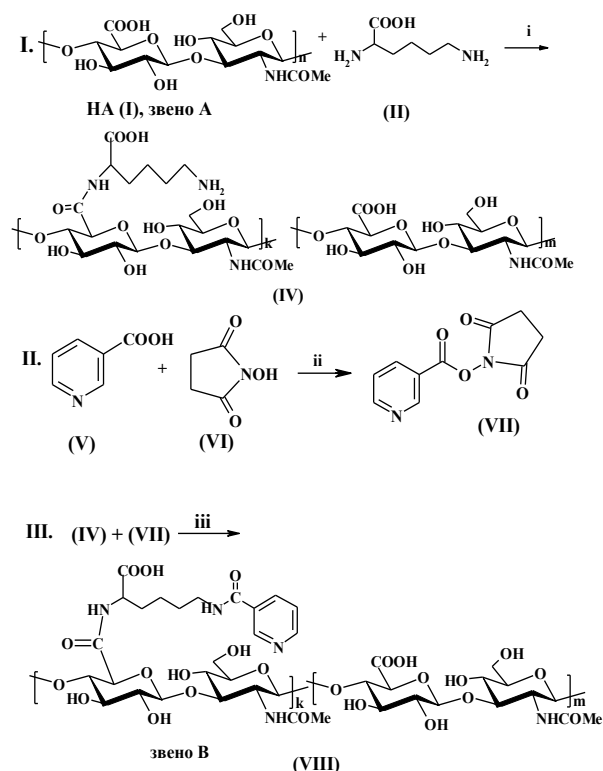
В синтезе конъюгатов гиалуроновой кислоты с производными никотиновой кислоты применяли два подхода с использованием 1) *N*-сукцинимидила никотиновой кислоты и D,L-лизина в качестве спейсера и 2) гидразида никотиновой кислоты и 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид в качестве водоотнимающего реагента. Из гидразидных производных синтезировали их 1-бензилникотиноилгидразидные и 1-бензил-1,4-дигидроникотиноилгидразидные аналоги. Выявлены полиамфолитные свойства конъюгатов.

Введение

Гиалуроновая кислота (НА, (I)) – гетерополисахарид линейного строения из класса кислых гликозаминогликанов широко применяется в медицине и косметике в качестве неиммуногенного биоматериала, обладающего репаративно-регенеративными свойствами. Особый интерес исследователей привлекают производные НА, ковалентно сшитые бифункциональными соединениями различной природы (диаминами, дигидрамидами кислот, диглицидиловыми эфирами, дивинилсульфоном) или полученные в результате комплексообразования (ионной сшивки) с неорганическими солями или органическими соединениями катионной природы. По сравнению с природной модифицированная НА обладает большей гидрофобностью, повышенной устойчивостью к действию фермента гиалуронидазы, и может применяться в качестве биосовместимого материала или транспортной системы, обеспечивающей контролируемое и пролонгированное высвобождение биоактивных молекул.

Одним из способов усилить внутри- и межцепное взаимодействие макромолекул является химическая модификация НА молекулами с зарядом, противоположным отрицательно заряженным карбоксильным группам НА. В качестве таких молекул, способных придать макромолекулам НА свойства полиамфолита, нами были выбраны физиологически значимые 3-пиридинкарбоновая (никотиновая) кислота и ее производные. В синтезе конъюгатов была использована карбоксигруппа НА. При конъюгации применялись два подхода: 1) присоединение кислоты (V) с использованием аминокислоты D,L-лизина (II) в качестве спейсера и 2) связывание гидразида никотиновой кислоты (IX) с помощью 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид (EDC) (III). В обоих случаях присоединение молекулы кислоты (V) к НА осуществлялось через стабильную амидную связь.

Первый подход выполнялся в три стадии (схема 1). Сначала НА (I) вовлекали в реакцию с 15–20-кратным избытком D,L-лизина (II) в присутствии EDC в водной среде (pH 4.7–4.8, 20–25°C). Карбодимид (III) в сухом виде добавляли к интенсивно перемешиваемому водному раствору



Реагенты и условия: i, (I):(II):(III):HOBT=1:5:2:2, H₂O, pH 6.8, 40 °C (2 ч), rt (24 ч);
ii, (V):(VI):DCC=1:1:1.1, DMF, 70°C, 2 ч;
iii, (IV):(VII)=1:6, NaHCO₃/DMF (1:1), pH 8.5, 20 °C, 16 ч.

Схема 1. Синтез конъюгата НА-D,L-лизин-НА

смеси НА/D,L-лизин. По истечении 12–14 ч продукт очищали диализом от низкомолекулярных примесей и осаждали избытком EtOH. Нингидринный тест на свободную аминогруппу был отрицательным, и ¹H ЯМР спектр продукта показал отсутствие сигналов лизина, что свидетельствовало о неактивности НА в этой реакции.

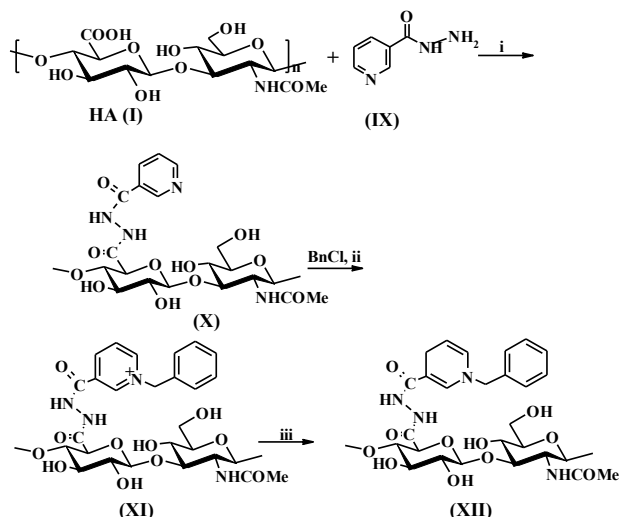
Увеличение pH среды до 6.8, добавление двукратного по отношению к НА количества *N*-гидроксисбензотриазола (HOBT) с одновременным уменьшением лизина способствовало успешному протеканию реакции: был получен продукт (IV), содержащий остатки лизина, селективно прореагировавшего по α-аминогруппе (схема 1). В ¹H ЯМР спектре сигналы в области δ 1.2–1.8 м.д.

отвечали метиленовым протонам β, γ, δ -CH₂-групп лизина, сигнал протонов ϵ -CH₂NH₂-группы был найден в области 2.91 м.д., и в HSQC спектре этот сигнал коррелировал с резонансом при 39.2 м.д. Интенсивность сигнала с δ 2.91 м.д. по отношению к интенсивности синглета ацетамидных групп НА (δ 1.92 м.д.), как внутреннему стандарту, была использована для расчета содержания лизин-модифицированных звеньев **B** (30% в расчете на 100 дисахаридных звеньев НА).

N-сукцинимидил никотиновой кислоты (**VII**) был синтезирован в DMF из эквимольных количеств кислоты (**V**) и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) (**VI**) в присутствии конденсирующего реагента *N,N*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и без выделения из реакционной смеси был использован для реакции с продуктом (**IV**).

На заключительной стадии лизин-модифицированная НА (**IV**) реагировала с избытком NHS-производного (**VII**) в водном DMF в присутствии NaHCO₃ с получением целевого конъюгата (**VIII**). ¹H ЯМР спектр продукта (**VIII**) показал отсутствие характеристического резонанса ϵ -CH₂NH₂-группы при 2.91 м.д., что свидетельствовало о нацело прошедшем ацилировании свободной NH₂-группы в остатке лизина *N*-сукцинимидилом (**VII**) и образовании эквивалентного количества (30%) содержащих остаток никотиновой кислоты звеньев **B**.

Согласно второму подходу для конъюгации использовали гидразид никотиновой кислоты (**IX**) (схема 2). Далее из гидразидных производных НА синтезировали их 1-бензилникотиноилгидразидные (кватернизированные) и 1-бензил-1,4-дигидроникотиноилгидразидные аналоги.



Реагенты и условия: i, (I):(III):(IX)=1:1.5:1, H₂O, pH 4.75, 20 °C, 1 ч; ii, DMF, 80 °C, 20 ч; iii, (XI):Na₂S₂O₄:K₂CO₃=1:1:1, DMF, 20 °C, 24 ч.

Схема 2. Конъюгация гиалуроновой кислоты с гидразидом никотиновой кислоты, последующая кватернизация гидразидного производного и восстановление

Конъюгаты НА с различным содержанием остатков гидразида никотиновой кислоты (20, 52 и

64%) были синтезированы действием 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодиимида (EDC) (**III**) на смесь НА/гидразид (H₂O, pH 4.75, 20 °C) при варьируемых соотношениях реагентов и времени реакции. Гидразид (**IX**) был получен взаимодействием никотиновой кислоты с гидразингидратом по известной методике, выход 90%. Содержание модифицированных звеньев в каждом конъюгате (**X**) было определено на основе ЯМР-интегрирования характеристических сигналов протонов пиридинового кольца в области δ 7.6-9.0 м.д., в качестве внутреннего стандарта был использован синглет метильных протонов MeCON-группы с δ 1.92 м.д. (рис.1)

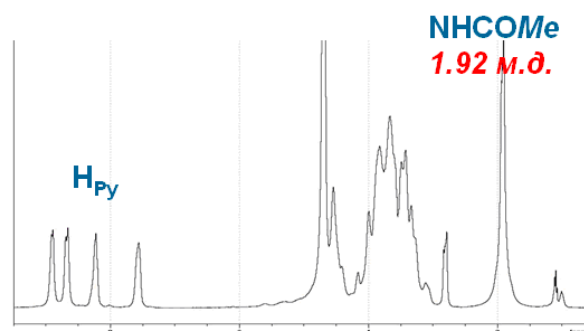


Рис. 1. Конъюгат гиалуроновой кислоты с гидразидом никотиновой кислоты (**X**)

Для реакции кватернизации (бензилирования) пиридинового азота и последующего восстановления кватернизированного фрагмента до 1,4-дигидроникотинового были использованы образцы конъюгата (**X**) с 20 и 52% содержанием модифицированных звеньев. В виде мелкоизмельченного порошка они гладко реагировали с избытком BnCl в среде безводного DMF (80 °C, 20 ч) с образованием соответствующих 1-бензильных производных (**XI**) (схема 2). В ¹H ЯМР спектрах (рис.2) обоих образцов в области δ 7.41-7.45 м.д. наблюдалось появление сигналов пяти протонов фенильного кольца и в области δ 5.85 м.д. – сигнала двух протонов CH₂Ph-группы.

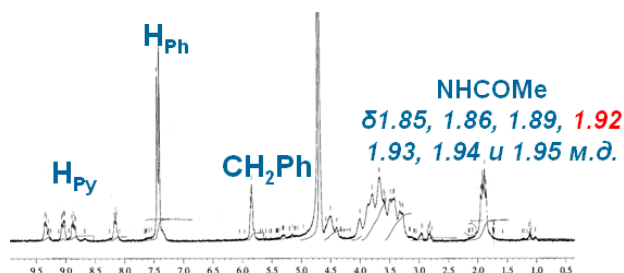


Рис. 2. Производное гиалуроновой кислоты и 1-бензилникотиновой кислот (**XI**)

При этом все четыре сигнала пиридинового кольца сдвигались в область более слабого поля (8.14-9.36 м.д.) по сравнению с аналогичными сигналами конъюгата (**X**). С появлением бензильного заместителя структура сигнала метильных протонов MeCON-группы стала более сложной: расщепление синглета дало 7 сигналов с δ 1.85, 1.86, 1.89, 1.92,

1.93, 1.94 и 1.95 м.д. Сдвиг в более сильное (1.85, 1.86 и 1.89 м.д.) и слабое (1.93, 1.94 и 1.95 м.д.) поля объясняется тем, что метильная группа звена глюкозамина, соседнего с модифицированным звеном глюкуроновой кислоты, может находиться как над плоскостью, так и в плоскости бензольного кольца, подвергаясь, соответственно, экранированию и дезэкранированию.

Далее оба кватернизованных образца (**X**) были подвергнуты реакции восстановления дитионитом натрия в смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ в присутствии K_2CO_3 . После очистки и осушки в вакууме образец с 52% степенью замещения не растворялся ни в одном из известных растворителей и поэтому не анализировался.

УФ- (λ_{max} 297 нм) и ^1H ЯМР (рис. 3) спектры образца, содержащего 20% модифицированных звеньев, показали, что все 1-бензилникотиновые фрагменты конвертировались в 1-бензил-1,4-дигидроникотиновые с образованием нового конъюгата (**XII**) (схема 1). В ^1H ЯМР спектре (**XII**) метиленовые протоны CH_2Ph -группы сместились в область 5.5-5.8 м.д.

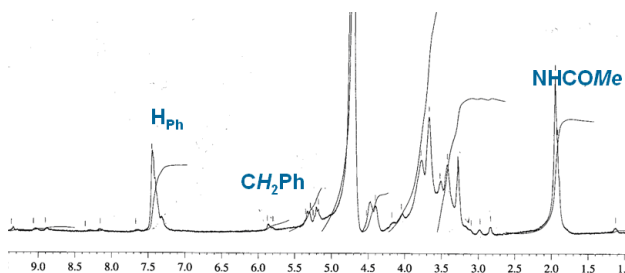


Рис. 3. 1-бензилникотиноилгидразидное производное гиалуроновой кислоты (**XII**)

Таким образом, с никотиновой кислотой и ее производными нами были синтезированы 4 вида конъюгатов НА, по природе являющихся полиамфолитами. Как известно, в водных растворах полиамфолиты чувствительны к изменению ионной силы и pH среды и могут образовывать дисперсии коллоидных частиц, мутность которых можно измерить спектрофотометрически при 500 нм. Полиамфолитные свойства конъюгатов в зависимости от pH (от 2 до 11) исследовали следующим образом: готовили несколько растворов соответствующего образца с концентрацией 4 мг/мл, pH каждого раствора доводили до нужного значения и измеряли поглощение (мутность) при 500 нм. Значения pH, при котором поглощение было максимальным, находились в области 5.0-5.5. Следует отметить, что значение 5.5 является физиологическим и применяется при изготовлении косметической продукции.

Результаты и обсуждение

Синтезированы конъюгаты гиалуроновой кислоты, содержащие в своем составе 20-50% никотиноильных, никотиноилгидразидных, 1-бензилникотиноилгидразидных (кватернизованных) или 1-бензил-1,4-

дигидроникотиноилгидразидных остатков. Установлены их полиамфолитные свойства.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.) регистрировали для растворов в D_2O на спектрометре Bruker AVANCE 400 (рабочая частота для ЯМР ^1H – 400.13 МГц, для ЯМР ^{13}C – 100.58 МГц), внутренний стандарт – ацетон. УФ-спектры растворов в воде получали на спектрофотометре Specord M-40. Контроль pH растворов осуществляли с помощью pH-метра «pH-340» (РФ). В работе использовались никотиновая кислота фармакопейной чистоты (Индия), N-гидроксисукцинимид, дитионит натрия, D,L-лизин, 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодиимид и гидразингидрат (Aldrich). Бензилхлорид очищали перегонкой.

Гиалуроновую кислоту (**I**) из пупочных канатиков новорожденных получали согласно работе¹. Гидразид (**IX**) синтезировали по методике².

Конъюгат НА с D,L-лизином (**IV**), соотношение реагентов (**I**):(**II**):(**III**):HOBt = 1:5:2:2. К смеси 60.0 мг (0.15 ммоль) НА, 137.0 мг (0.75 ммоль) D,L-лизина и 40.5 мг (0.3 ммоль) HOBt в 15 мл H_2O добавляли NaOH до pH 6.8, затем при 40 °C и интенсивном перемешивании вносили 57.5 мг (0.3 ммоль) (**III**), поддерживая pH титрованием 0.1 н HCl. Через 2 ч нагревание отключили и оставили на 24 часа при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли 45 мл EtOH. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 5 мл H_2O , добавляли 15 мл EtOH. Вновь выпавший осадок центрифугировали, промывали EtOH (5×3 мл) и Et_2O (5×3 мл) и сушили при $t \leq 60^\circ\text{C}$ и пониженном давлении. Получили 62 мг белого порошка. Фрагмент спектра ^1H -ЯМР: δ : 1.2-1.8 (6H, β, γ, δ - CH_2), 1.91 (с, 3H, MeCON), 2.91 (м, 2H, CH_2NH_2), 3.15-3.95 (H_2 -H6, 10H в глюкопиранозильных звеньях GlcA и GlcNAc), 4.12 (1H, NHCHCOOH), 4.35-4.44 (H1, 2H в глюкопиранозильных звеньях GlcA и GlcNAc).

N-гидроксисукцинимидил никотиновой кислоты (**VII**) К 0.2 г (1.63 ммоль) Nic и 0.19 г (1.63 ммоль) NHS в 1.5 мл ДМФА добавляли при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке 0.37 г (1.79 ммоль) измельченного DCC в сухом виде. Реакционную смесь перемешивали при 20-25°C в течение 3-4 ч, контролируя завершенность реакции методом ТСХ на пластинах Sorbfil (Сорбполимер, г. Краснодар) $R_f=0.87$ (этилацетат/петролейный эфир, 2:1). Без выделения из реакционной смеси N-гидроксисукцинимидил (**VII**) использовали в реакции с лизин-модифицированной НА (**IV**).

Конъюгат (**VIII**). К раствору (**VII**) в ДМФА (5 мл) добавляли по каплям при перемешивании раствор 30 мг (0.076 ммоль) (**IV**) в 5 мл 0.1 М водного раствора бикарбоната натрия (pH 8.5). Перемешивали при 20-25°C в течение 10-12 ч. Раствор нейтрализовали, диализовали против воды в течение 1 суток, затем упаривали до 5-6 мл. Реакционную смесь осаждали трехкратным избытком MeOH. Выпавший осадок отделяли

центрифугированием, дополнительно очищали трехкратным переосаждением из воды метанолом, промывали MeOH (5×3 мл), затем Et₂O (5×3 мл) и сушили при t≤60 °С и пониженном давлении

Конъюгат (X). При комнатной температуре растворяли в 15 мл H₂O 60 мг (0.15 ммоль) (I), 35 мг (0.225 ммоль) (III) и при интенсивном перемешивании вносили 30 мг (0.15 ммоль) (III). Соотношение реагентов (I):(III):(IX)=1:1.5:1. С помощью 0.1н HCl устанавливали pH реакции на уровне 4.75. Через 1 ч приливали этанол, осадок центрифугировали, промывали последовательно этанолом, затем диэтиловым эфиром и выдерживали при пониженном давлении. Выход 59 мг. Фрагмент спектра ¹H-ЯМР: δ: 1.92-1.95 (с, 3H, MeCON), 3.0-4.25 (H2-H6, 10H в глюкопиранозильных звеньях GlcA и GlcNAc), 7.45-8.98 (4H, H_{Py}).

Конъюгат (XI). Суспендировали в 1.1 мл ДМФА 15 мг (0.033 ммоль) (X), добавили 11.25 мкл бензилхлорида. Нагревали, при интенсивном перемешивании и температуре 80°С выдерживали 20 ч. Осаждали этанолом, центрифугировали. Промывали 2 раза этанолом и 2 раза диэтиловым эфиром. Выход 15 мг. Фрагмент спектра ¹H-ЯМР: δ: 1.85-1.95 (м, 3H, MeCON), 2.75-4.10 (H2-H6, 10H в

глюкопиранозильных звеньях GlcA и GlcNAc), 5.85-5.88 (2H, CH₂Ph), 7.41-7.46 (4H, H_{Ph}), 8.14-9.36 (4H, H_{Py}).

Конъюгат (XII). К 15 мл продукта (V), полученного в предыдущем опыте, добавили 4.5 мг Na₂S₂O₄ (дитионита) в воде, 4.5 мг K₂CO₃ в воде, приливали 450 мкл ДМФА. Соотношение реагентов Na₂S₂O₄:K₂CO₃=1:1:1. Выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Приливали воду, осаждали EtOH, центрифугировали, растворили в воде, затем снова переосадили. Промыли 2 раза EtOH и Et₂O. Выход 15 мг. Фрагмент спектра ¹H-ЯМР: δ: 1.90 (с, 3H, MeCON), 3.15-4.20 (H2-H6, 10H в глюкопиранозильных звеньях GlcA и GlcNAc), 5.15-5.30 (2H, CH₂Ph), 7.40(4H, H_{Ph}).

Библиографический список

- 1 Понеделькина И.Ю., Одинокое В.Н., Вахрушева Е.С., Голикова М.Т., Халилов Л.М., Джемилов У.М. // *Биоорг. Химия*. **2005**. Т. 31. № 1. С. 90-95.
- 2 Patent US3951996. Process for making nicotinic acid hydrazides / Robert Holroyd Stanley, Barry Leigh Shaw. Priority Date 4.01.1973; publication info 20.04.1976; Data supplied from the espacenet .com, 1976, с.3